
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL DIFTERIEI

Difteria este o toxiinfecție acută, contagioasă, a copiilor sau adulților, cauzată de *Corynebacterium diphtheriae*

25.1. DATE GENERALE

25.1.1. O minidefiniție

Corinebacteriile sunt bacili grampozitivi, cu granule metacromatice, măciucați, dispuși în unghiuri și palisade. Imobili, nesporulați, neacidorezistenți. Facultativ anaerobi, dar unele specii sunt aerobe, oxidazonegativi și catalazopozitivi. Atacă zaharurile fermentativ sau deloc.

25.1.2. Repere taxonomice și habitat

Genul *Corynebacterium* reunește numeroase specii, unele cu tropism uman, altele patogene pentru animale sau pentru plante.

Speciile cu tropism uman. Mai cunoscută este *C. diphtheriae*, cauza difteriei. *C. minutissimum* determină o afecțiune cutanată: eritrasma. *C. mycetoides* poate produce ulcere cutanate tropicale.

O serie de specii comensale în microflora tegumentului și mucoaselor pot determina infecții la gazda imunocompromisă: septicemii, endocardite, pneumonii. Așa sunt: *C. xerosis*, *C. jeikeium* (specie particularizată prin rezistența la multiple antibiotice), *C. pseudodiphthericum*, găzduită în nazofaringe, și *C. matruchotii*, component al plăcii dentare, sunt comensale nepatogene.

Puține din speciile patogene pentru animale infectează accidental omul. Așa sunt: *C. pseudotuberculosis* sau *C. ulcerans*.

C. diphtheriae are 3 biovaruri: *gravis*, *mitis* și *intermedius* cu peste 50 serovaruri și multiple fizaruri. Bacilii difterici sunt rezistenți la uscăciune. În fragmente de falsă membrană și secreții nazofaringiene uscate și la adăpost de lumină supraviețuiesc mai multe luni. De aceea difteria se poate transmite și prin pulberi contaminate.

Surse de infecție în difterie sunt omul bolnav și purtătorii sănătoși de tulpini toxigene ale bacililor difterici.

25.1.3 Factori de patogenitate

C. diphtheriae este o bacterie toxigenă prin conversie lizogenică. Tulpinile agresive elaborează enzime ca hialuronidaza, neuraminidază, care favorizează difuziunea toxinei de la poarta de intrare a infecției.

Toxina difterică este un inhibitor al sintezei proteice cu efecte necrotice la poarta de intrare a infecției și în țesuturi, unde difuzează pe cale sangvină. O toxină identică produc tulpini lizogene de *C. ulcerans*.

25.1.4. Receptivitatea la infecțiile cu corinebacterii

Toate persoanele cu mai puțin de 0,01 unități antitoxină difterică/ml ser sunt receptiv la difterie.

Receptivitatea la bacilii difterimorfi din microflora normală a fost precizată mai sus.

25.1.5. Difteria

Poarta de intrare uzuală a infecției este faringele. Rar, mai ales în condiții de promiscuitate, poarta de intrare poate fi conjunctiva, plăgile sau vulva. Toxina difterică necrozează epiteliul și țesutul subiacent la poarta de intrare. Bacilii difterici se multiplică în țesutul necrotic, unde rămân cantonați, iar toxina difuzează în organism pe cale sangvină. Un exsudat fibrinos infiltrat cu leucocite polimorfonucleare și hematii cuprinde țesutul necrotic, formând la suprafața leziunii o *falsă membrană* cu aspectul unui depozit cenușiu, a cărui detașare, dificilă, lasă o suprafață sângerândă. Falsa membrană are tendință la extindere. Când cuprinde laringele (*crupul difteric*) duce la asfixie. Ganglionii limfatici cervicali și țesuturile gâtului sunt edemațiate. Semnelor locale li se asociază fenomene generale: febră, stare toxică. Toxina difterică determină leziuni necrotice în miocard (*miocardita difterică*), rinichi, glandele suprarenale, nervi (*polinevrita difterică*). Pacienții au leucocitoză cu neutrofilie. În formele hipertoxice apare un sindrom hemoragic, iar pacienții mor în 24—48 ore prin miocardită difterică, supraviețuitorii fac paralizii ale vălului palatin, mușchilor oculari sau extremităților.

25.2. INVESTIGAȚII DE LABORATOR PENTRU CONFIRMAREA DIFTERIEI

Data fiind gravitatea bolii, prezumția clinică hotărăște terapia specifică a difteriei. Examenul bacteriologic confirmă sau infirmă acest diagnostic într-un interval în care actul terapeutic este deja consumat.

25.2.1. Diagnosticul microbiologic

25.2.1.1. Prelevate patologice

Se prelevă trei tampoane prin detașarea unei porțiuni marginale din *falsa membrană* (amigdaliană, conjunctivală, vulvară sau a unei plăgi) și un tampon nazofaringian pe cale nazală.

Pentru depistarea portajului, se prelevă 2 tamponane: unul nazofaringian și unul faringian.

Cu primul tampon prelevat din leziune se efectuează extemporaneu 2 frotiuri, care după fixare, sunt expediate la laborator împreună cu celelalte tamponane. Dacă examinarea întârzie mai mult de 2 ore, se vor imersa tamponanele într-un mediu de transport: geloză semilichidă 0,1% cu 10% ser sangvin și telurit de potasiu sau OCST (ou-cistină-ser-telurit de potasiu), care pot funcționa și ca medii de îmbogățire.

25.2.1.2. Microscopia directă

Microscopia directă se efectuează pe cele două frotiuri: unul colorat Neisser, celălalt Gram. În contextul reacției inflamatorii cu polimorfonucleare se urmărește prezența de bacili drepecți sau incurbați, cu capete măciucate, așezați în unghiuri și palisade, ca literele chinezești, cu granule de volutină (corpusulii Babes-Ernst) dispuse polar și colorate metacromatic în albastru pe fondul galben-brun al bacililor în colorația Neisser. Pe frotiul colorat Gram, bacilii difterici apar gramvariabil cu granulele de volutină violete pe fondul bacterian roșu.

Valoarea microscopiei directe este orientativă din cauza asemănării morfologice a *C. diphtheriae* cu bacilii difterimorfi. Oricum, microscopia diferențiază angina difterică de cea ulceronecrotică Plaut-Vincent determinată de o asociație fusospirochetoică.

25.2.1.3. Izolarea și identificarea

Etapa I. Al doilea tampon se epuizează pe:

- o placă cu mediu selectiv diferențial, Tinsdale (geloză-ser-cistină-telurit de potasiu-tiosulfat), sau Bucin (geloză-sânge cu hinozol), cu incubare la 37 °C timp de 24—48 ore,
- o placă cu geloză-sânge cu incubare peste noapte la 37°C.

Dubla însămânțare se impune din două motive:

- Se controlează calitatea prelevării. Pe mediul selectiv poate să nu apară cultură; dacă aceasta lipsește și pe geloză-sânge prelevatul a fost necorespunzător.
- Unele angine streptococice simulează difteria, caz în care însămânțarea numai pe mediul selectiv dă rezultat fals negativ.

În fine, unele forme grave ale difteriei se datorează infecției mixte bacil difteric—*S. pyogenes*.

Al treilea tampon prelevat din leziune, ca și tamponul nazofaringian sunt imersate și incubate în mediul OCST pentru îmbogățire peste noapte la 37°C. A doua zi se epuizează prelevatul îmbogățit pe mediul selectiv de izolare. La fel se procedează și cu cele două tamponane prelevate de la purtători.

Etapa II. Se examinează culturile de pe mediul selectiv urmărind coloniile suspecte de bacili difterici: colonii negre cu halou brun pe mediul Tinsdale sau colonii albastre pe mediul Bucin. Se repică pe mediul Loeffler (bulion glucozat 1% ser de bou coagulat în pantă) câteva colonii suspecte, bine izolate, pentru a obține, după incubare peste noapte la 37°C, cultura stock necesară identificării. Pe mediile cu telurit de potasiu coloniile unor specii de stafilococ sunt asemănătoare cu cele ale bacililor difterici. De aceea, înainte de repicarea pentru cultura pură, fiecare colonie de pe mediul selectiv cu telurit de potasiu va fi controlată microscopic, pentru a le evita pe cele de stafilococi.

Pe mediul Loeffler bacilii difterici cultivă preferențial în 14—18 ore, formând colonii mici, opace, cu aspectul picăturilor de spermanțet.

Tabelul 25.1. Caractere diferențiale între bacilul difteric și alte corinebacterii

Specia	Cistinază	Urează	Fosfatază	Acid din	
				glucoză	galactoză
<i>C. diphtheriae</i> ¹ :					
■ <i>gravis</i>	+	—	—	+	+
■ <i>intermedius</i>	+	—	—	+	+
■ <i>mitis</i>	+	—	—	+	+
<i>C. jeikeium</i>	—	—	NC	+	+
<i>C. matruchotii</i>	—	d	—	+	—
<i>C. minutissimum</i>	—	—	+	+	NC
<i>C. mycetoides</i>	—	—	+	—	—
<i>C. pseudodiphthericum</i>	—	+	—	—	—
<i>C. xerosis</i>	—	—	—	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	—	+	+
<i>C. ulcerans</i>	+	+	—	+	+

Simboluri: ↔ — 90% sau mai mult din tulpini pozitive; ←→ — 90% sau mai mult din tulpini negative;
d — 11—89% din tulpini pozitive; NC — necomunicat.

Etapa III. Se identifică izolatele prin:

a) Studiul *caracterelor microscopice* pe frotiu colorat Neisser și Gram. Bacilii difterici au morfologia tipică de bacili corineformi cu numeroase granule de volutină dispuse polar numai în cultura pe mediul Loeffler sau în falsa membrană.

b) Studiul *caracterelor de cultură* pe mediile cu telurit de potasiu coroborat cu activitatea biochimică permite identificarea celor 3 biovaruri de *C. diphtheriae* (tabelul 25.1).

c) Studiul *caracterelor biochimice*:

■ *Testul cistinazei* (Pizu). Hidrogenul sulfurat eliberat din cistină sub acțiunea cistinazei produse de bacilii difterici reacționează cu acetatul de plumb și formează sulfură de plumb neagră. Izolatele sunt însămânțate prin înțepare în coloană de geloză-ser cu cistină și acetat de plumb. Înnegrirea traiectului de însămânțare cu halou cafeniu după incubare peste noapte semnifică un test pozitiv. Cistinază produc numai bacilii difterici și *C. ulcerans*. Restul bacililor difterimorfi dau testul negativ.

■ *Testul ureazei* este negativ pentru bacilii difterici și variabil la speciile difterimorfe.

■ *Testul fosfatazei* este negativ pentru *C. diphtheriae* și variabil cu specia de bacili difterimorfi.

■ *Fermentarea zaharurilor* (glucoză, maltoză, zaharoză etc.) și polizaharidelor (dextrină, amidon) diferențiază nu numai speciile de corinebacterii, ci și biovarurile bacilului difteric (tabelul 25.1).

■ *Testul hemolizei* este pozitiv pentru biovarul *mitis* al bacililor difterici.

Tabelul 25.1 (continuare)

Specia	Acid din				
	manitol	maltoză	zaharoză	glicogen	amidon
<i>C. diphtheriae</i> ¹ :					
■ <i>gravis</i>	+	+	—	+	+
■ <i>intermedius</i>	+	+	—	+	—
■ <i>mitis</i>	+	+	—	d	—
<i>C. jeikeium</i>	—	—	—	NC	NC
<i>C. matruchotii</i>	+	+	+	+	—
<i>C. minutissimum</i>	d	+	+	NC	—
<i>C. mycetoides</i>	—	—	NC	—	NC
<i>C. pseudodiphthericum</i>	—	—	—	—	—
<i>C. xerosis</i>	+	—	+	—	—
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	d	d	—
<i>C. ulcerans</i>	NC	+	—	d	+

¹ Biovarurile de *C. diphtheriae*, aspectul coloniilor:
 ■ pe geloză-sânge cu cistină și telurit de potasiu:
 — *gravis*: cenușiu-închis, mari, plate, uscate crenelate («floare de margaretă»);
 — *intermedius*: cenușii cu centrul negru, acuminat uscat;
 — *mitis*: negre, mici, lucioase, bombate;
 ■ pe mediul Tinsdale biovarurile *gravis* și *mitis* formează halou brun după 24 ore, *intermedius* după 48 ore.

d) *Structura antigenică.* Reacții de aglutinare cu seruri polivalente și monospecifice identifică bacilii difterici și serovarurile lor, care pot fi folosite ca markeri epidemiologici.

e) *Lizotiparea* tulpinilor toxigene și netoxigene de bacili difterici este necesară în scopuri epidemiologice: stabilirea tulpinilor epidemice circulante, investigații în focarele de difterie.

f) *Testul toxigenezii* finalizează identificarea tulpinilor de *C. diphtheriae* izolate de la bolnavi sau de la purtători, pentru că numai acestea sunt patogene.

■ *Testul de toxigeneză in vitro (testul Elek)* — vezi 25.2.2.1. Tulpinile toxigene dau testul pozitiv în 24—48 ore (rareori după 72—120 ore).

■ *Testul de toxigeneză in vivo* este un test de neutralizare efectuat pe cobai sau iepuri. Se inoculează cultura de 24 ore în bulion sau suspensie în bulion a culturii de pe mediul Loeffler.

Pentru *testul subcutanat* se inoculează la 2 cobai, în regiunea abdominală, 2 ml din cultura tulpinii testate, unul din cobai fiind protejat cu 2 ore înainte prin injectarea intraperitoneală a 1000 U antitoxină difterică. Animalele sunt urmărite de la 24 ore până la 30 zile. Cobaiul neprotejat face fenomene specifice intoxicației difterice: moartea în 24—96 ore cu necroză și edem gelatinos la locul de inoculare, congestia capsulelor suprarenale, congestie cu acumulare de exsudat în pleură, pericard, peritoneu. În cazul tulpinilor slab patogene cobaiul supraviețuiește mai mult, cu escară locală, pierdere progresivă în greutate și paralizii după 15—20 zile de la inoculare. Cobaiul martor, protejat specific, rămâne indemn.

Intradermic se pot testa 8—10 tulpini pe un cobai și 15—20 tulpini pe un iepure. Testul pe iepure este cel mai sensibil. Se injectează, în puncte separate, pe jumătatea dreaptă a spatelui depilat, câte 0,1 ml cultură la iepuri și 0,2 ml la cobai. După 4 ore se injectează intravenos 2000 U antitoxină difterică la iepure și 1000 UA intraperitoneal la

cobai, iar după 10 minute se inoculează intradermic pe jumătatea stângă a spatelui, în poziții similare, cultura aceluiași tulpini. Între tulpinile injectate una trebuie să fie sigur toxigenă: martorul pozitiv. Reacția pozitivă: eritem, infiltrat, necroză dermică în punctul de inoculare din jumătatea dreaptă cu absența leziunii în punctul simetric din jumătatea stângă a spatelui.

Etapa IV. Se analizează, se interpretează rezultatele și se redactează buletinul de analiză: e. g. «Se confirmă diagnosticul de difterie prin izolarea de *C. diphtheriae* toxigen» sau «Hemocultura izolează *Corynebacterium jeikeium* rezistent la următoarele antibiotice ... și sensibil numai la ...».

25.2.2. Controlul receptivității la difterie și eficienței vaccinării

Intradermoreacția Schick controlează receptivitatea la difterie. Pe fața antebrațului drept se inoculează intradermic 0,2 ml toxină Schick (toxină difterică stabilizată și diluată pentru a conține 1/50 DLM cobai/0,2 ml), iar la antebrațul stâng, în poziție simetrică, se inoculează, ca martor, 0,2 ml toxină Schick inactivată termic. Reacția se citește după 48 ore, urmărind intensitatea și diametrul zonei congestiv-infiltrative de la locul de inoculare a toxinei și martorului. *Reacția pozitivă:* zonă congestiv-infiltrativă cu diametrul de peste 10 mm numai la locul de inoculare a toxinei; traduce receptivitatea la difterie. *Reacția negativă:* nici o modificare la locul de inoculare a toxinei; traduce imunitatea la difterie, toxina a fost neutralizată.

O zonă congestiv-infiltrativă atât la locul de inoculare a toxinei, cât și a martorului traduce sensibilizarea la toxină fie a unei persoane imune, fie a uneia receptivă la difterie. Dacă în 96 ore după inoculare congestia și infiltrația dispar la ambele antebrațe, este *pseudoreacție*. Dacă dispar la martor, dar persistă la locul de inoculare a toxinei este *reacție combinată*; persoana fiind receptivă la difterie și sensibilizată, trebuie vaccinată cu doze fracționate.

În suspiciunea difteriei la adulți cu starea generală nealterată, tratamentul specific cu antitoxină difterică se poate temporiza așteptând rezultatul testului Schick. Un test negativ exclude diagnosticul de difterie.

Eficiența vaccinării antidifterice se poate controla prin i. d. r. Schick sau prin reacția de hemaglutinare indirectă (care utilizează ca antigen hematii tanate sensibilizate cu anatoxină difterică), reacția de neutralizare ori ELISA. Testul Schick negativ sau prezenta a peste 0,01 UA/ml ser semnifică eficiența vaccinării.

25.2.3. Biopreparate pentru diagnosticul de laborator, profilaxia și tratamentul specific al difteriei

- Seruri aglutinante antidifterice polivalent și monospecifice pentru identificarea antigenică a serovarurilor.
- Set de bacteriofagi antidifterici pentru lizotipia culturilor de *C. diphtheriae*.
- Ser antidifergic hiperimun heterolog. Serul terapeutic este conservat prin fenol (vezi tabelul 2.6). Pentru testul Elek este necesar ser antidifergic nefenolat.
- Imunoglobuline umane hiperimune antidifterice.
- Anatoxină difterică (monovaccin), anatoxină difterică plus anatoxină tetanică (bivaccin), pentru revaccinări sau trivaccinul antidifterotetanopertussis pentru primovaccinarea copiilor.
- Toxină difterică purificată Schick pentru testarea intradermică a receptivității la difterie.